

by: Brian Fish

**TITLE: CHIMERIC IMMUNOGLOBULINS SPECIFIC FOR p55 TAC PROTEIN  
OF THE IL-2 RECEPTOR**

**ABSTRACT:**

The present invention provides novel compositions useful, for example, in the treatment of T-cell mediated human disorders, the compositions containing human-like immunoglobulins specifically capable of blocking the binding of human IL-2 to its receptor and/or capable of binding to the p55 Tac protein on human IL-2 receptors. The immunoglobulins can have two pairs of light chain/heavy chain complexes, typically at least one pair having chains comprising mouse complementarity determining regions functionally joined to human framework region segments. For example, mouse complementarity determining regions, with or without additional naturally-associated mouse amino acid residues, can be used to produce human-like antibodies capable of binding to the human IL-2 receptor at affinity levels stronger than about  $10^8 \text{ M}^{-1}$ .

The immunoglobulins, including binding fragments and other derivatives, of the present invention may be produced by a variety of recombinant DNA techniques, with ultimate expression in transfected cells, preferably immortalized eukaryotic cells, such as myeloma or hybridoma cells. Polynucleotides comprising a first sequence coding for human-like immunoglobulin framework regions and a second sequence set coding for the desired immunoglobulin complementarity determining regions can be produced synthetically or by combining appropriate cDNA and genomic DNA segments.

The human-like immunoglobulins may be utilized alone in substantially pure form, or complexed with a cytotoxic agent, such as a radionuclide, a ribosomal inhibiting protein or a cytotoxic agent active at cell surfaces. All of these compounds will be particularly useful in treating T-cell mediated disorders. The human-like immunoglobulins or their complexes can be prepared in a pharmaceutically accepted dosage form, which is dependent on the mode of administration.

The present invention also provides novel methods for designing human-like immunoglobulin chains having one or more complementarity determining regions (CDR's) from a donor immunoglobulin and a framework region from a human immunoglobulin, the preferred methods comprising first comparing the framework or variable region amino acid sequence of the donor immunoglobulin to corresponding sequences in a collection of human immunoglobulin chains, and selecting as the human immunoglobulin one of the more homologous sequences from the collection. The human immunoglobulin, or acceptor immunoglobulin, sequence is typically selected from a collection of at least 10 to 20 immunoglobulin chain sequences, and usually will have the highest homology to the donor immunoglobulin sequence of any sequence in the collection. The human immunoglobulin framework sequence will typically have about 65 to 70% homology or more to the donor immunoglobulin framework sequences. The donor immunoglobulin may be either a heavy chain or light

chain (or both), and the human collection will contain the same kind of chain. A humanized light and heavy chain can be used to form a complete humanized immunoglobulin or antibody, having two light/heavy chain pairs, with or without partial or full-length human constant regions and other proteins.

In another embodiment of the present invention, either in conjunction with the above comparison step or separately, additional amino acids in an acceptor immunoglobulin chain may be replaced with amino acids from the CDR-donor immunoglobulin chain. More specifically, further optional substitutions of a human framework amino acid of the acceptor immunoglobulin relying on a framework amino acid from a donor immunoglobulin will be made at positions in the immunoglobulins where:

- (a) said amino acid in the human framework region of an acceptor immunoglobulin is rare for that position and the corresponding amino acid in the donor immunoglobulin is common for that position in human immunoglobulin sequences; or
- (b) said amino acid is immediately adjacent to one of the CDR's; or
- (c) said amino acid is predicted to be within about 3Å of the CDR's in a three-dimensional immunoglobulin model and capable of interacting with the antigen or with the CDRs of the humanized immunoglobulin.

The humanized immunoglobulin chain will typically comprise at least about 3 amino acids from the donor immunoglobulin in addition to the CDR's, usually at least one of which is immediately adjacent to a CDR in the donor immunoglobulin. The heavy and light chains may each be designed by using any one or all three of the position criteria.

When combined into an intact antibody, the humanized light and heavy chains of the present invention will be substantially non-immunogenic in humans and retain substantially the same affinity as the donor immunoglobulin to the antigen (such as a protein or other compound containing an epitope). These affinity levels can vary from about  $10^8$  M<sup>-1</sup> or higher, and may be within about 4 fold of the donor immunoglobulin's original affinity to the antigen.

⑩ 公表特許公報 (A)

平4-502408

⑩ 公表 平成4年(1992)5月7日

⑩ Int. Cl.<sup>1</sup>  
C 12 P 21/08

識別記号

庁内整理番号

8214-4B  
8717-4B  
7236-4B

審査請求 未請求

予備審査請求 有

C 12 N 15/00  
5/00

部門 (区分) 1 (1)

A  
B※

(全 16 頁)

⑩ 発明の名称 I L-2 レセプターの p55 T a c タンパク質に特異的なキメラ免疫グロブリン

⑩ 特 願 平2-503577

⑩ 出 願 平1(1989)12月28日

⑩ 出 願 文 提出日 平3(1991)5月1日

⑩ 国 際 出 願 PCT/US89/05857

⑩ 国 際 公 開 番 号 WO90/07861

⑩ 国 際 公 開 日 平2(1990)7月26日

優先権主張 ⑩ 1988年12月28日 ⑩ 米国 (U S) ⑩ 290,975

⑩ 発 明 者 クイーン, カリー エル.

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94304, パロ アルト, オーク  
クリーク ドライブ 1300

⑩ 出 願 人 プロテイン デザイン ラブ  
ス, インコーポレイテッド

アメリカ合衆国, カリフォルニア 94304, パロ アルト, ポー  
ー ドライブ 3181

⑩ 代 理 人 弁理士 青 木 朗 外 3 名

⑩ 指 定 国 AT, AT (広域特許), AU, BB, BE (広域特許), BF (広域特許), BG, BJ (広域特許), BR, CF (広域  
特許), CG (広域特許), CH, CH (広域特許), CM (広域特許), DE, DE (広域特許), DK, ES (広域特  
許), FI, FR (広域特許), GA (広域特許), GB, GB (広域特許), HU, IT (広域特許), JP, KP, KR,  
LK, LU, LU (広域特許), MC, MC, ML (広域特許), MR (広域特許), MW, NL, NL (広域特許), N  
O, RO, SD, SE, SE (広域特許), SN (広域特許), SU, TD (広域特許), TG (広域特許)

最終頁に続く

特 許 範 囲

1. p55 Tacタンパク質と特異的に反応する実質的に純粋なヒト免疫グロブリンを含んで成る組成物。
2. 前記免疫グロブリンが2対の軽鎖/重鎖二量体を含んで成り、各鎖が可変領域と定常領域を含んで成る、請求項1に記載の組成物。
3. ヒトインターロイキン-2 (IL-2) レセプターへのヒトIL-2の結合を阻害することができる実質的に純粋なヒト免疫グロブリンを含んで成る組成物。
4. 前記免疫グロブリンが約  $10^6 M^{-1}$  またはそれより強いヒトインターロイキン-2 (IL-2) への結合親和性を示す、請求項1に記載の組成物。
5. 前記免疫グロブリンが1つの免疫グロブリンからの相補性決定領域および少なくとも1つの異なる免疫グロブリンからのフレームワーク領域を含んで成る、請求項1に記載の組成物。
6. ヒト免疫グロブリンフレームワークおよび天然には該フレームワークと関連がないまたは複数の外側の相補性決定領域を含んで成る組換え免疫グロブリン組成物であって、前記免疫グロブリンがヒトインターロイキン-2 レセプターに結合することができる組成物。
7. 前記免疫グロブリンがIgG, 免疫グロブリンイソタイプである、請求項5に記載の組成物。
8. 成熟軽鎖および重鎖可変領域タンパク質配列が図3お

よび図4中の成熟タンパク質配列と実質的に相同である、請求項6に記載の組成物。

9. 2対の軽鎖/重鎖二量体を有し且つ少なくとも約  $10^6 M^{-1}$  の親和力でヒトインターロイキン-2 レセプター上のエピトープと特異的に反応することができるヒト免疫グロブリンであって、前記軽鎖および重鎖が相補性決定領域 (CDR) とヒト免疫グロブリンフレームワーク領域を含んで成り、ここでCDRが該フレームワーク領域とは異なる免疫グロブリンからのものである、ヒト免疫グロブリン。

10. ヒトインターロイキン-2 (IL-2) レセプターへのインターロイキン-2 (IL-2) の結合を阻止することができる、請求項9に記載の免疫グロブリン。

11. ヒトインターロイキン-2 レセプターに結合することができるヒト免疫グロブリンであって、前記免疫グロブリンはヒト免疫グロブリンフレームワーク中に抗-Tac 抗体からの1または複数の相補性決定領域 (CDR) を含んで成り、ここで前記ヒト免疫グロブリンフレームワーク領域は抗-Tac 抗体から選択された少なくとも1つのアミノ酸を含んで成る、ヒト免疫グロブリン。

12. 図3に示されるような成熟重鎖可変配列、および図4に示されるような成熟軽鎖可変配列を有する、請求項11に記載のヒト免疫グロブリン。

13. 抗-Tac 抗体からの追加のアミノ酸がCDRのすぐ近くに存在する、請求項11に記載のヒト免疫グロブリン。

14. ヒト患者においてT細胞介在性障害を処置する方法であって、前記患者に治療的有効量の請求項1に記載の免疫グ

ロブリンを授与することを含んで成る方法。

15. ミニローマまたはハイブリドーマ細胞中で生成された請求項1に記載の免疫グロブリン。

16. ヒト免疫グロブリンフレームワーク領域をコードする第一の配列および1または複数のマウス免疫グロブリン相補性決定領域をコードする第二の配列を含んで成るポリヌクレオチド分子であって、発現時に p55 Tacタンパク質と特異的に反応し且つヒトT細胞上のインターロイキン-2レセプター (IL-2) へのIL-2の結合を阻止することができる免疫グロブリンをコードする前記ポリヌクレオチド分子。

17. 請求項16のポリヌクレオチドによりトランスフェクトされた細胞系。

18. 供与体Igからの1または複数の相補性決定領域およびヒトIgからのフレームワーク領域を有するヒト化免疫グロブリン組の設計方法であって、供与体Ig軽鎖または重鎖のフレームワークまたは可変領域のアミノ酸配列をヒトIg組のコレクション中の対応する配列と比較し；そしてヒトIg軽鎖または重鎖のフレームワークを提供するためにコレクションからの約3つの最も相補性の配列のうちの1つを選択することを含んで成る方法。

19. ヒト受容体免疫グロブリンからのフレームワーク領域および抗原に結合することができる供与体免疫グロブリンからの相補性決定領域(CDR)を有するヒト化免疫グロブリン組の設計方法であって、下記のような免疫グロブリン中の位置において、受容体免疫グロブリンの少なくとも1つのヒトフ

レームワークアミノ酸を供与体免疫グロブリンからの対応するアミノ酸で置換する段階を含んで成る方法：

(a) 受容体免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域中のアミノ酸がその位置においてまれであり、そして供与体免疫グロブリンの対応するアミノ酸がヒト免疫グロブリン配列中の前記位置において普通である；または

(b) 該アミノ酸がCDRの1つのすぐ近くである；または

(c) 該アミノ酸が三次元免疫グロブリンモデルにおいてCDRの約3Å以内に側鎖原子を有しそして抗原またはヒト化免疫グロブリンのCDRと相互作用することができると予想される。

20. 前記ヒト化免疫グロブリン組が、CDRに加えて、請求項(a)、(b)または(c)により選択された供与体免疫グロブリンからの少なくとも3アミノ酸を含んで成る、請求項19に記載の方法。

21. 供与体から置換されたアミノ酸のうちの少なくとも1つがCDRのすぐ近くである、請求項20に記載の方法。

22. 請求項18、19または20に従って設計されたヒト化免疫グロブリン。

## 明 細 書

### IL-2レセプターの p55 Tacタンパク質に 特異的なモノクローナル抗体

#### 発明の分野

本発明は一般に、新規治療薬を開発するための経口投与DNA技術とモノクローナル抗体技術の組合せに關し、更に詳しくは、非免疫原性抗体の製造およびそれらの利用に關する。

#### 発明の背景

哺乳類では、外来物質、即ち抗原、と特異的に相互作用する2つのタイプの細胞によって免疫応答が媒介される。それらの細胞タイプの1つであるB細胞は、抗体の生産を担う。第二の細胞クラスであるT細胞は、B細胞とT細胞を含む広範な他の造血細胞の両者の生体内機能を調節する様々な細胞サブセットを包含する。

T細胞がこの調節に力を及ぼす1つの方法は、最初にT細胞増殖因子と命名されたインターロイキン-2 (IL-2) として知られるリンホカインの生産を通してである。IL-2の主な機能はT細胞の増殖と維持であると思われる。実際、成る免疫学者はIL-2が全免疫応答の中心にあるだろうと考えている (Farrar, J. ら, *Immunol. Rev.* 63: 129-166 (1982) 参照、これは参考として本明細書に組み込まれる)。

その生物学的作用を及ぼすために、IL-2は特異的な高

親和性膜レセプターと相互作用する (Greene, M. ら, *Progress in Hematology* XIV, E. Brown編, Grune and Stratton, New York (1986), 283-頁)。ヒトIL-2レセプターは複雑な多量体の膜タンパク質であり、1本の鎖は Tacペプチドとして知られ約55kDのサイズである (Leonard, M. ら, *J. Biol. Chem.* 260: 1872 (1985) 参照、これは参考として本明細書中に組み込まれる)。このタンパク質をコードする遺伝子が単離されており、そして21アミノ酸のシグナルペプチドを含む272アミノ酸のペプチドを産生している (Leonard, M. ら, *Nature* 311: 626 (1984) 参照)。p55 Tacタンパク質のN-末端の219アミノ酸は明らかに細胞外領域を含んで成る (Leonard, M. ら, *Science* 230: 633-639 (1984) 参照、これは参考として本明細書に組み込まれる)。

ヒトIL-2レセプターの構造と機能の解明のほとんどは、特異的反応性モノクローナル抗体の開発のためである。特に、抗-Tac として知られるマウスモノクローナル抗体 (Uchiyama ら, *J. Immunol.* 126: 1393 (1981)) は、IL-2レセプターがT細胞上だけでなく、単球-マクロファージ群、肝臓のクッパー細胞、皮膚のランゲルハンス細胞およびもちろん活性化されたT細胞上でも検出され得ることを示した。重要なことには、静止T細胞、B細胞または樹状細胞にあるマクロファージは、典型的にはIL-2レセプターを提示しない (Herrmann ら, *J. Exp. Med.* 162: 1111 (1985))。

抗-Tac モノクローナル抗体は、IL-2相互作用を必要とするリンパ球機能を明らかにするために用いられており、

そして細胞培養における細胞毒性およびナブレッナー-Tリンパ球の発色を含む様々なT細胞機能を抑制することが示されている。また、抗-Tac および他の抗体を用いた研究に基づき、様々な患者、特に成人T細胞白血病がT細胞による不適当なIL-2レセプター発現に關係づけられている。

より最近になって、IL-2レセプターはT細胞介在性疾患に対する新規治療アプローチの理想的な標的であることが示された。IL-2レセプター特異的抗体、例えば抗-Tacモノクローナル抗体を単独または免疫複合体（例えばリシンA相、同位体等との免疫複合体）として用いて、IL-2レセプターを有する細胞を効果的に除去できることが提唱されている。例えばそれらの薬剤は、理論上はIL-2レセプターを発現している白血病細胞、或る種のB細胞、または病状に関与する活性化されたT細胞を排除することができ、その上さらに必要とされる時には成熟正常T細胞およびその前駆体の保持によって正常T細胞免疫応答を開始する能力を確保する。一般に、他のT細胞特異的薬剤の多くは本質的に全ての周辺のT細胞を破壊し得、このことは薬剤の治療効果を制限する。全体に、IL-2レセプターに特異的な適当なモノクローナル抗体の使用は、自己免疫疾患、器官移植および活性化されたT細胞による任意の望ましくない応答において選択的効用を有することができ得る。実際、例えば抗-Tac抗体を使って臨床試験が開始されている（一般に、Waldman, T.ら、*Cancer Res.* 45: 625 (1985)およびWaldman, T., *Science* 232: 727-732 (1986)を参照のこと；これらは特

考として本明細書中に組み込まれる）。

不運にも、抗-Tac および他の非ヒトモノクローナル抗体の使用は、特に下記に説明されるような繰り返しの治療法において、いくつかの欠点を有する。例えば、マウスモノクローナル抗体はヒト抗体を十分に結合せず、そしてヒトにおいて使用すると他の重要な免疫グロブリン機能特性を欠く。

おそらくより重要なのは、抗-Tac および他の非ヒトモノクローナル抗体が、ヒト患者に注入すると免疫原性となるであろう実質的な長さのアミノ酸配列を含むことである。外来抗体の注入は、抗体に対して患者により誘起された免疫応答が非常に強力であり、最初の処置後の抗体の治療効用を本質的に排除しうることを多数の研究が示している。更に、様々な病気を処置するために増加する数の異なるマウスまたは他の抗原性（ヒトに対して）モノクローナル抗体が開発されることが期待されるので、任意の異なる非ヒトモノクローナル抗体での第一または第二の処置後、無関係の治療のためでもその後の処置が無効または危険になり得る。

いわゆる「キノウ抗体」（例えば、ヒト正常領域に連結されたマウス可変領域）は幾らか好結果であることが判明したが、重要な免疫原性の問題が残っている。一般に、多数のヒト抗原と同じく、ヒトIL-2レセプターと反応するヒト免疫グロブリンの生産は、典型的なヒトモノクローナル抗体生産技術を使うことは非常に困難である。同様に、いわゆる「ヒト化された」抗体（例えばEPO公報No.0239400を参照のこと）を作製するために超微量DNA技術を使用すること

は、一部は予想不可能な結合親和性のためである不確かな結果を提供する。

従って、ヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、さらに治療剤および他の用途に適当である形態において容易に且つ経済的に生産される改良形のヒト免疫グロブリン、例えばヒトIL-2レセプターに特異的なもの、に対する要求が存在する。本発明はそれらおよび他の要求を満たす。

#### 発明の要約

本発明は、例えばT細胞により媒介されるヒト患者の処置において有用である新規組成物を提供し、該組成物は、IL-2レセプターへのヒトIL-2の結合を特異的に阻止することができそして/またはヒトIL-2レセプター上のp55 Tacタンパク質に結合することができるヒト免疫グロブリンを含む。該免疫グロブリンは、2対の軽鎖/重鎖複合体を有し、典型的には少なくとも1対がヒトフレームワーク領域セグメントに機能的に連結されたマウス相補性決定領域を含んで成る如くを有する。例えば、追加の天然由来のマウスアミノ酸残基を有するかまたは有しないマウス相補性決定領域を用いて、約 $10^6 M^{-1}$ よりも強力な親和力レベルにおいてヒトIL-2レセプターに結合することができるヒト抗体を生産することができる。

結合性断片または他の誘導体を包含する免疫グロブリンは、様々な超微量DNA技術により、トランスフェクトされた細胞、好ましくは不死化された真核細胞、例えばミエロママ

またはハイブリドーマ細胞中での最大発現を使って生産することができる。ヒト免疫グロブリンフレームワーク領域をコードする第一の配列と所望の免疫グロブリン相補性決定領域をコードする第二の配列を含んで成るポリヌクレオチドは、合成的にまたは適当なcDNAとゲノムDNAセグメントを結合することによって作製することができる。

ヒト免疫グロブリンは、実質的に純粋な形態で単独に、または細胞毒性物質、例えば放射線核種、リソソーム阻害タンパク質もしくは細胞表面において毒性な細胞毒性物質と複合体化して、使用することができる。それらの化合物は全て、特にT細胞により媒介される障害を処置することにおいて有用であろう。ヒト免疫グロブリンまたはそれらの複合体は、投与の形式に依存するであろう薬理上許容される剤形において調製することができる。

本発明は、供与体免疫グロブリンからの1または複数の相補性決定領域(CDR)およびヒト免疫グロブリンからのフレームワーク領域を有するヒト免疫グロブリン鎖を設計するための新規方法も提供する。好ましい方法は、供与体免疫グロブリンのフレームワークまたは可変領域のアミノ酸配列をヒト免疫グロブリン鎖のコレクション中の対応する配列と比較し、そして該コレクションからより相同性の高い配列の1つをヒト免疫グロブリンとして選択することを含んで成る。ヒト免疫グロブリンまたは受容体免疫グロブリン配列は、典型的には少なくとも10-20の免疫グロブリン鎖配列のコレクションから選択され、そして通常は該コレクション中のいずれ

かの配列の供与体免疫グロブリン配列に最も高い相同性を有するだろう。ヒト免疫グロブリンフレームワーク配列は、供与体免疫グロブリンフレームワーク配列に対して典型的には約65~70%またはそれ以上の相同性を有するだろう。供与体免疫グロブリンは重鎖または軽鎖（または両方）のいずれであってもよく、そしてヒトコレクションは同じ種類の鎖を含むだろう。ヒト化された軽鎖または重鎖を用いて、部分または全長のヒト定常領域および別のタンパク質を含むかまたは含まない、2対の軽鎖/重鎖を有する完全なヒト化免疫グロブリンまたは抗体を形成せしめることができる。

本発明の別の態様によれば、上記の比較段階と共にまたは別々に、受容体免疫グロブリン中の追加のアミノ酸をCDR-供与体免疫グロブリン鎖からのアミノ酸と置き換えることができる。更に特定のには、供与体免疫グロブリンからのフレームワークアミノ酸による受容体免疫グロブリンのヒトフレームワークアミノ酸の異なる任意の置換は、次のような免疫グロブリン中の位置において行うことができる：

(a) 受容体免疫グロブリンのヒトフレームワーク領域中の該アミノ酸がその位置に希であり、そして供与体免疫グロブリン中の対応するアミノ酸がヒト免疫グロブリン中のその位置に普遍である；

(b) 該アミノ酸がCDRの1つのすぐ近くである；または

(c) 該アミノ酸が三次元免疫グロブリンモデルにおいてCDRの約3Å以内にあり、そしてヒト化免疫グロブリンの

CDRまたは抗原と相互作用することができると予想される。

ヒト化免疫グロブリン鎖は、典型的には、CDRに加えて、供与体免疫グロブリンからの少なくとも約3アミノ酸を含んでおり、通常は少なくともその1つが供与体免疫グロブリン中のCDRのすぐ近くであろう。3つの位置基準のうちのいずれか1つまたは全部を使うことにより重鎖および軽鎖を各々設計することができる。

完全な抗体に結合される時、本発明のヒト化された軽鎖および重鎖はヒトにおいて実質的に非免疫原性であり、そして供与体免疫グロブリンと実質的に同じ抗原（例えばエヒトープを含むタンパク質または他の化合物）への親和力を保持しているだろう。それらの親和力レベルは約 $10^6 M^{-1}$ 以上から様々に異なることができ、そして抗原への供与体免疫グロブリンのものと親和力の約4倍以内であろう。

#### 図面の簡単な説明

図1：抗-Tac 重鎖（上行）およびEu重鎖（下行）の配列の比較。アミノ酸の1文字記号が用いられている。各行の最初のアミノ酸に左側に番号を付けてある。2つの配列中の同じアミノ酸は線でつながれている。3つのCDRには下線が付してある。ヒト化抗-Tac 重鎖においてEuアミノ酸よりもむしろ抗-Tac アミノ酸が使用された他のアミノ酸位置は\*で示されている。

図2：抗-Tac 軽鎖（上行）およびEu軽鎖（下行）の配列の比較。アミノ酸の1文字記号が用いられている。各行の

最初のアミノ酸に左側に番号を付けてある。2つの配列中の同じアミノ酸は線でつながれている。3つのCDRには下線が付してある。ヒト化抗-Tac 重鎖においてEuアミノ酸よりもむしろ抗-Tac アミノ酸が使用された他のアミノ酸位置は\*で示されている。

図3：ヒト化抗-Tac 重鎖可変領域遺伝子のスクレオチド配列。タンパク質をコードする遺伝子の部分についての断片アミノ酸配列がスクレオチド配列の下に示されている。該遺伝子の始まりと終わりのスクレオチドTCTAGAはIba I部位である。成熟重鎖配列はアミノ酸#20のQで始まる。

図4：ヒト化抗-Tac 軽鎖可変領域遺伝子のスクレオチド配列。タンパク質をコードする遺伝子の部分についての断片アミノ酸配列がスクレオチド配列の下に示されている。該遺伝子の始まりと終わりのスクレオチドTCTAGAはIba I部位である。成熟軽鎖配列はアミノ酸#21のDで始まる。

図5：A、ヒト化抗-Tac 重鎖遺伝子を合成するのに用いた、5' から3' 方向に記載した4つのオリゴスクレオチドの配列。B、前記オリゴスクレオチドの相対位置。矢印は各オリゴスクレオチドの3' 方向を指している。

図6：(A) ヒト化抗-Tac 軽鎖遺伝子を合成するのに用いた、5' から3' 方向に記載した4つのオリゴスクレオチドの配列。(B) 前記オリゴスクレオチドの相対位置。矢印は各オリゴスクレオチドの3' 方向を指している。JF02とJF03とのオーバーラップ中のBind III部位の位置が示されている。

図7：ヒト化抗-Tac 重鎖を表現させるのに用いるプラスミドpHsLTAC1の略図。関係する制限部位が示されており、そして重鎖のコード領域が箱として表示されている。免疫グロブリン(Ig)プロモーターからの転写方向が矢印により示されている。E. = 重鎖ニオンハーター、Hys = ヒグロマイシン耐性遺伝子。

図8：ヒト化抗-Tac 軽鎖を表現させるのに用いるプラスミドpHsLTAC2の略図。関係する制限部位が示されており、そして軽鎖のコード領域が箱として表示されている。Igプロモーターからの転写方向が矢印により示されている。

図9：抗-Tac 抗体またはヒト化抗-Tac 抗体に次いで複合としてフルオレセイン接合ヤギ抗マウスIg抗体またはヤギ抗ヒトIg抗体でそれぞれ染色されたHut-102およびJurkat細胞のフルオロサイトメトリー。各パネルにおいて、点線曲線は第一抗体が削除された時の結果を示し、実線曲線は記載された第一および第二（複合）抗体を含む時の結果を示す。

図10：(A) 指標されるような0~40ngの抗-Tac、次いでビオチン化抗-Tac、次にフィコニトリン接合アビジンで染色されたHut-102細胞のフルオロサイトメトリー。

(B) 指標の抗体、次いでビオチン化抗-Tac、次にフィコニトリン接合アビジンで染色されたHut-102細胞のフルオロサイトメトリー。

## 発明の詳細な説明

本発明の一態様によれば、所望のエピトープ、例えばヒト T細胞上の I-L-2 レセプター上のエピトープ、と特異的に反応するヒト様免疫グロブリンが提供される。それらの免疫グロブリンは、少なくとも約  $10^4 M^{-1}$ 、好ましくは  $10^5 M^{-1}$  ~  $10^6 M^{-1}$  またはそれ以上の結合親和力を有し、例えばヒト I-L-2 レセプターへの I-L-2 の結合を阻止することができる。ヒト様免疫グロブリンは、ヒト様フレームワークを有し、そして p55 Tac タンパク質上のエピトープと特異的に反応する免疫グロブリン、典型的にはマウス免疫グロブリンからの相補性決定領域(CDR)を有することができる。本発明の免疫グロブリンは、経皮的に大量に生産することができ、例えば、種々の技術によるヒト患者における T細胞介在性障害の処置において、用途を見出す。

基本的な抗体構造単位は 4 量体を含むことが知られている。各 4 量体は全く同じ 2 対のポリペプチド鎖から成り、各対は 1 本の「軽」(約 25kD) 鎖と 1 本の「重」(約 50-70kD) 鎖を有する。各鎖の NH<sub>2</sub>-末端は、主に抗原認識を担う約 100 ~ 110 またはそれ以上のアミノ酸の可変領域で始まる。各鎖の COOH-末端は、主にエフェクター機能を担う定常領域を限定する。

軽鎖は  $\kappa$  または  $\lambda$  のいずれかとして分類される。重鎖は  $\gamma$ 、 $\mu$ 、 $\alpha$ 、 $\delta$  または  $\epsilon$  として分類 (および細分類) され、そしてそれぞれ IgG、IgM、IgA、IgD および IgE として抗体のインタイプを規定する。軽鎖および重鎖中の可変および定常領域

に組み込まれる)。 (一般に、Hood ら、"Immunology", Benjamin, N. Y., 第 2 版 (1984); 並びに Hunkapiller および Hood, *Nature*, 323: 15-16 (1985) を参照のこと。これらは参考として本明細書中に組み込まれる。)

キメラ抗体は、典型的には遺伝子操作によって軽鎖および重鎖遺伝子が異なる種に属する免疫グロブリン遺伝子セグメントから作製されている抗体である。例えば、マウスモノクローナル抗体由来の遺伝子の可変 (V) セグメントをヒト定常 (C) セグメント、例えば  $\gamma$ 、および  $\mu$ 、に結合することができる。典型的な製法用キメラ抗体はマウス抗体からの V または抗原結合領域とヒト抗体からの C またはエフェクター領域とから成るハイブリッドタンパク質である (例えば、A. T. C. 登録番号 CRL 9688 は抗-Tac キメラ抗体を分泌する) が、他の哺乳動物種を使用することもできる。

本明細書中で使用する「フレームワーク領域」なる用語は、Kabat ら、前掲により定義されたように、単一種において異なる免疫グロブリン間で比較的に保存される免疫グロブリン軽鎖および重鎖可変領域の部分について呼称する。本明細書中で使用する「ヒト様フレームワーク領域」なる用語は、各々存在する種においてヒト免疫グロブリン中のものと等しい少なくとも約 70 またはそれ以上のアミノ酸残基、典型的には 75 ~ 85 またはそれ以上のアミノ酸残基を含んで成るフレームワーク領域である。

本明細書中で使用する「ヒト様免疫グロブリン」なる用語は、ヒト様フレームワーク領域を含んで成る免疫グロブリン

は、約 12 またはそれより多数のアミノ酸の "J" 領域により連結され、重鎖は約 12 またはそれより多数のアミノ酸の "D" 領域も含む (一般に、Fundamental Immunology, Paul, W. 編、第 7 巻、第 131-166 頁、Raven Press, N. Y. (1984) を参照のこと; これは参考として本明細書中に組み込まれる)。

各軽鎖/重鎖対の可変領域は抗原結合部位を形成する。鎖は全て、3 つの超可変領域によって結合された比較的保存されたフレームワーク領域という同じ一般構造を示す ("Sequences of Proteins of Immunological Interest", Kabat, E. ら、U. S. Department of Health and Human Services, (1933); 並びに Chothia および Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196: 901-917 (1987) を参照のこと。これらは参考として本明細書中に組み込まれる)。各対の二本鎖からの CDR は、フレームワーク領域によって整列され、特異的エピトープへの結合を可能にする。

本明細書中で使用する「免疫グロブリン」なる用語は、免疫グロブリン遺伝子により実質的にコードされる 1 または複数のポリペプチドから成るタンパク質について呼称する。認識される免疫グロブリン遺伝子としては、 $\kappa$ 、 $\lambda$ 、 $\alpha$ 、 $\gamma$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$  および  $\mu$  定常領域遺伝子、並びに無数の免疫グロブリン可変領域遺伝子が挙げられる。免疫グロブリンは抗体の他に様々な形態で存在することができ、例えば、Fr. Fab および F(ab)<sub>2</sub>、並びに一本鎖を含む (例えば、Huston ら、*Proc. Nat. Acad. Sci. U. S. A.*, 85: 5879-5883 (1988) および Bird ら、*Science*, 242: 423-426 (1988)。これらは参考として本明

について言及し、この場合、存在する任意の定常領域がヒト免疫グロブリン定常領域と実質的に相同であり、即ち少なくとも約 85-90%、好ましくは約 95% が同一である。よって、おそらく CDR を除くヒト様免疫グロブリンの全ての部分が、1 または複数の生来のヒト免疫グロブリン配列の対応部分と実質的に相同である。例えば、ヒト様免疫グロブリンはマウス可変領域/ヒト定常領域キメラ抗体を含まないだろう。

本発明の別の一般的特点によれば、ヒト化された免疫グロブリン鎖を含んで成る抗体の親和力を増加させるために、ヒト鎖またはヒト化免疫グロブリン鎖のフレームワーク中の限定された数のアミノ酸が受容体 Ig よりもむしろ供与体 Ig 中のそれらの位置のアミノ酸と同じであるように選択される基序も含まれる。

本発明のこの観点とは、(例として CDR の入手親としてマウス抗体を使つて) ヒト化抗体を生産する従来方法における親和力の低下の 2 つの原因が、下記のためであるというモデルに基づく:

(1) マウス CDR をヒトフレームワークと結合する時、CDR に密着したフレームワーク中のアミノ酸がマウスの代わりにヒトになる。理論に結び付けようとせずに、本発明者らは、それらの変更されたアミノ酸が供与体マウス抗体中とは異なる静電的または疎水力を生じるため、それらがわずかに CDR を歪め、そして歪められた CDR は供与抗体中の CDR が行うのと同じくらい効果的な抗原との接触を行うことができないと考える;

(2) また、CDRに包含しているがその一部ではない(即ちまだフレームワークの一部である)元のマウス抗体中のアミノ酸は、親和力の源泉である抗原との接触を行うことができる。全てのフレームワークアミノ酸がヒトにされるので、抗体がヒト化される時にそれらのアミノ酸は失われる。

それらの問題を回避するため、および所望の抗原に対し非常に強力な親和力を有するヒト化抗体を生産するために、本発明はヒト化免疫グロブリンを設計するのに次の4つの基準を使用する。それらの基準を単独または必要な時に組み合わせ使用し、所望の親和力または他の特徴を獲得することができる。

基準I: 受容体として、ヒト化しようとする供与体免疫グロブリンに非常に相同である特定のヒト免疫グロブリンからのフレームワークを使用するか、または多数のヒト抗体からの共通のフレームワークを使用すること。例えば、データバンク(例えばNational Biomedical Research Foundation Protein Identification Resource)中のヒト重鎖(軽鎖)可変領域に対するマウス重鎖(軽鎖)可変領域の配列の比較は、異なるヒト領域に対する相同性の程度が典型的には約40%から約60-70%まで大幅に異なることを示す。受容体免疫グロブリンとして、供与体免疫グロブリンの重鎖(それぞれ軽鎖)に最も相同であるヒト重鎖(それぞれ軽鎖)の1つを選択することにより、供与体免疫グロブリンから受容体免疫グロブリンに移る際にはほとんどアミノ酸が変化しないであろう。よって、ヒト化免疫グロブリン鎖を含んで成るヒト化抗体の正

確な全形状が供与抗体の形状と非常によく似ており、CDRを認める見込みを増やすことができる。

典型的には、重鎖フレームワークを提供するために、少なくとも約10-20の別個のヒト重鎖の代表的コレクションの中の3-5の最も相同な重鎖可変領域配列のうちの1つが受容体として選択され、軽鎖についても同様にして選択されるだろう。好ましくは、1-3の最も相同な領域のうちの1つが使用されるだろう。選択された受容体免疫グロブリン鎖は、供与体免疫グロブリンに対してフレームワーク領域内が最も好ましくは少なくとも約65%の相同性を有するだろう。

いかにして受容体免疫グロブリンを選択するかにかかわらず、受容体よりもむしろ供与体中のそれらの位置のアミノ酸と同じになるようにヒト化免疫グロブリン鎖のフレームワーク中の少数のアミノ酸を選択することによって、より高い親和力を獲得することができる。好ましくは、それらの基準の1つを満足するほとんどまたは全てのアミノ酸位置において、供与体アミノ酸が実際に選択されるだろう。

基準II: ヒト受容体免疫グロブリンのフレームワーク中のアミノ酸が、普通でない(即ち「まれである」; 本明細書中で使用されるこの用語は、代表的なデータバンク中のヒト重鎖(それぞれ軽鎖)V領域配列のたった約10%しかその位置に存在しないアミノ酸を示す)場合、またはその位置の供与体アミノ酸がヒト配列に典型的である(即ち「普通である」; 本明細書中で使用されるこの用語は、代表的なデータバンク中の少なくとも約25%の配列に存在するアミノ酸を示す)場

合、受容体よりもむしろ供与体アミノ酸が選択されるだろう。この基準は、ヒトフレームワーク中の普通でないアミノ酸が抗体構造を破壊しないことを保証するのに役立つ。更に、普通でないアミノ酸をたまたまヒト抗体に典型的である供与抗体からのアミノ酸で置換することにより、ヒト化抗体を低免疫原性にすることができる。

基準III: ヒト化免疫グロブリン鎖中の3つのCDRのすぐ近くの位置において、受容体アミノ酸よりもむしろ供与体アミノ酸が選択されるだろう。それらのアミノ酸は、おそらく特にCDR中のアミノ酸と相互作用し、もし受容体から選択されれば供与体CDRを破壊しそして親和力を低下させるであろう。更に、近隣のアミノ酸は抗原と直接相互作用し(Amitら、*Science*, **233**, 747-753 (1986)、これは参考として本明細書中に組み込まれる)、供与体からそれらのアミノ酸を選択することは元の抗体における親和力を提供する場合の抗原接触を維持するのに望ましいかもしれない。

基準IV: 典型的には元の供与抗体の3次元モデルは、CDRの外側の幾つかのアミノ酸がCDRに密接しておりそして水素結合、ファンデルワールス力、疎水的相互作用等によりCDR中のアミノ酸と相互作用する相当な確率を有することを示す。それらのアミノ酸位置では、受容体免疫グロブリンアミノ酸よりもむしろ供与体アミノ酸が選択される。この基準に従ったアミノ酸は、通常はCDR中の成る部位の約3人単位内に側鎖原子を有し、そして独立された化学的力、例えば上記に列挙した力に従ってCDR原子と相互作用するこ

とができるような原子を含まなければならない。抗体などのタンパク質のモデルを作成するためのコンピュータープログラムが一般に利用可能であり、そして当業者に周知である

(Loewら、*Int. J. Quant. Chem., Quant. Biol. Symp.*, **15**: 55-66 (1988); Bruccoleriら、*Science*, **233**: 755-758 (1986)を参照のこと。これら全てが参考として本明細書中に組み込まれる)。それらは本発明の部分を構成しない。実際、全ての抗体が類似の構造を有するので、Brookhaven Protein Data Bankから入手可能である既知の抗体を必要であれば別の抗体のモデルとして利用することができる。商業的に入手可能であるコンピュータープログラムを用いてコンピューター画面にそれらのモデルを表示し、原子間の距離を算出し、そして様々なアミノ酸相互作用の可能性を評価することができる。

ヒト化またはヒト様抗体は、ヒト免疫において使用されるマウス抗体または成る場合にはキヌラ抗体を上回る少なくとも3つの相互的利益を有する:

1) エフェクター部分がヒトであるため、ヒト免疫系のその他の部分と良好に反応することができる(例えば、細胞依存性細胞障害作用(CDC)または抗体依存性細胞障害作用(ADCC)により、より効果的に標的細胞を破壊する)。

2) ヒト免疫系は外来物としてヒト化抗体のフレームワークまたは定常領域を認識しないであろう。従ってそのような在入抗体に対する抗体応答は全体的に外来のマウス抗体または部分的に外来のキヌラ抗体に対するよりも小さいであろう。

3) 在入されたマウス抗体は、通常の抗体の半減期よりも



ずっと短いヒト第三中の半減期を有することが報告されている (O. Snavra, *J. Immunol.*, **138**: 4534-4538 (1987))。注入されたヒト化抗体は、おそらく天然のヒト抗体により類似した半減期を有し、より少量または少頻度の用量を与えることを可能にするだろう。

本発明は、EPA公報No 0239400に記載されたものに関して改善されたヒト化免疫グロブリン (例えば、ヒトIL-2レセプターに結合することができる) に特に関与する。その出願明細書 (その開示は本発明の範囲から除かれる) は、成る種の免疫グロブリンについて、受容体抗体の軽鎖または重鎖可変領域中のCDR領域を異なる特性の抗体からのCDRの類似部分 (典型的には宿主の影響を受けやすい部分) で置換することを記載している。また、その出願明細書は、成る種の免疫グロブリンについて、抗原結合部位から (必ずしも) 影響されやすい残基を単に移動する可能性を記載しており、この残基は明らかに幾つかのフレームワーク領域を含むことができる (特に、Amitら、*Science*, **233**: 747-753 (1986)) に記載されたような抗原結合に関与することが既知である残基、またはおそらく間接相互作用に必須である残基 (ただしそれらの選択については該出願明細書において不十分な指針しか与えられていない)。例えば、本発明の好ましい型は、全CDRアミノ酸およびCDRの1つ (または好ましくは各々) のすぐ近くのフレームワークアミノ酸を置換することを伴う。一般に、例えばコンネクション (および普通はそれらの抗原結合特性) を維持するためにCDRと連結をとる

任意のフレームワーク残基が、上記に詳細に記載された本発明の好ましい型種の範囲内に納められる。

1つの観点において、本発明は、所望のエキソープ、例えばヒトIL-2レセプター上のエキソープ、に結合することができる免疫グロブリン (例えば抗-Tacモノクローナル抗体) からの重鎖および/または軽鎖CDR (典型的には上述したような別のアミノ酸残基を有する) をコードする超短DNAセグメントに向けられる。それらの領域をコードするDNAセグメントは、典型的にはヒト様フレームワーク領域をコードするDNAセグメントに結合されるだろう。例えば、発現時に抗-Tac重鎖および軽鎖超可変領域 (ヒト様フレームワーク領域と共に) を含んで成るポリペプチド鎖をコードする好ましいDNA配列がそれぞれ図3と図4に示されている。コドン最適および重要でないアミノ酸置換のため、添えるようにそれらの配列の代わりに他の配列を容易に用いることができる。

前記DNAセグメントは、典型的には、ヒト様抗体のコード配列に作用可能に連結した発現調節DNA配列、例えば天然由来のまたは異種のプロモーター領域、を更に含むだろう。好ましくは発現調節配列は、真核生物宿主細胞を感染転写またはトランスフェクションせしめることができるベクター中の真核生物プロモーター系であろうが、原核生物宿主用の調節配列を用いることができる。ベクターが適当な宿主中に組み込まれれば、宿主はスクレオチド配列の高レベル発現に適当な条件下で維持され、そして所望する時、軽鎖、重鎖、重

鎖/重鎖二量体もしくは完全な抗体、結合性断片または他の免疫グロブリン形態の取得および精製を行うことができる。

ヒト定常領域DNA配列は、周知の方法に従って、種々のヒト細胞から、好ましくは不死化されたB細胞から単離することができる (Kabat、前掲およびWP 87/02571を参照のこと)。例えば、ヒト $\kappa$ 免疫グロブリン定常およびJ領域遺伝子および配列はHeiterら、*Cell* **22**: 197-207 (1980)中に記載されており、そしてヒト免疫グロブリンC $\gamma$ 、遺伝子のスクレオチド配列はEl-Hisouら、*Nucl. Acid Res.* **10**: 4071 (1982)中に記載されている (その両者は参考として本明細書中に組み込まれる)。本発明の免疫グロブリンを複製するためのCDRは、所望の抗原 (例えばヒトIL-2レセプター) に結合することができるモノクローナル抗体から同様にして誘導され、そしてマウス、ラット、ウサギまたは抗体を生産することができる他の脊椎動物を含む任意の便利な哺乳動物起源において生産されるだろう。DNA配列の適当な起源細胞並びに免疫グロブリンの発現および分泌のための宿主細胞は、多数の入手源、例えばアフリカン・タイプ・カルチャー・コレクションから入手することができる ("Catalogue of Cell Lines and Hybridomas", 第5版 (1985) Rockville, Maryland, U.S.A.; これは参考として本明細書中に組み込まれる)。

本明細書中に特定的に記載のヒト様免疫グロブリンに加えて、他の「実質的に相同の」変型免疫グロブリンを容易に設計することができ、そして当業者に周知の様々な超短DNA

A技術を使って製造することができる。例えば、IL-2レセプター-免疫グロブリンについては、フレームワーク領域は幾つかのアミノ酸置換、末端および中間の付加および削除等により一次構造レベルで図3および図4の配列と異なることができる。更に、本発明のヒト様免疫グロブリンを基準として、種々の異なるヒトフレームワーク領域を単独または組合せて用いることができる。一般に、遺伝子の発現は種々の周知の技術、例えば部位特異的突然変異研究 (GillmanおよびSmith, *Gene* **8**: 81-97 (1979) 並びに Robertsら、*Nature* **323**: 731-734 (1987)を参照のこと; この両者は参考として本明細書中に組み込まれる) により容易に達成することができる。あるいは、一次抗体構造の一部のみを含んで成るポリペプチド断片を製造することができ、この断片は1または複数の免疫グロブリン活性 (例えば抗体結合活性) を有する。また多数の遺伝子と同様、免疫グロブリン関連遺伝子は、各々が1または複数の別個の生物活性を有する別々の機能性領域を含むため、該遺伝子を別の遺伝子からの機能性領域 (例えば蘇美; 1987年12月15日提出の一般譲渡されたU.S.S.N. 132,387を参照のこと。これは参考として本明細書中に組み込まれる) と融合させ、新規性質を有する融合タンパク質 (例えば免疫毒素) を製造することができる。

最終的に所望のヒト様抗体を発現することができる本発明の核酸配列は、様々な異なるポリスクレオチド (ゲノムDNAまたはcDNA、RNA、合成オリゴスクレオチド等) および成分 (例えばV、J、DおよびC領域) から、そして様々な異

なる技術により、形成せしめることができる。適当なゲノム配列を送達することが現在最も一般的な製造方法であるが、cDNA配列を使用してもよい（ヨーロッパ特許公報No.6239403およびLeichman, L.ら, Nature 332: 323-327 (1987)を参照のこと。この両者は参考として本明細書中に組み込まれる）。

前に述べたように、該DNA配列を発現調節配列に作用可能に連結した（即ち、機能を保持するように配置させた）後、該配列が宿主中で発現されるだろう。それらの発現ベクターは、典型的にはエピソードとしてまたは宿主染色体DNAの組み込み部分として宿主中で複製可能である。一般に、発現ベクターは、所望のDNA配列により形質転換された細胞の検出を可能にするために選択マーカー、例えばテトラサイクリンまたはネオマイシン耐性遺伝子を含むだろう（例えば、米国特許第4,704,362号を参照のこと；これは参考として本明細書中に組み込まれる）。

大腸菌(*E. coli*)は本発明のDNA配列をクローニングするのに特に有用な原核生物宿主である。使用に適当な他の微生物宿主としては、バチルス属、例えばバチルス・サブチリス(*Bacillus subtilis*)、並びに他の腸内細菌、例えばサルモネラ属(*Salmonella*)、セラチア属(*Serratia*)および他のシュードモナス属(*Pseudomonas*)種が挙げられる。それらの原核生物宿主では、典型的には宿主細胞と適合性である発現調節配列（例えば複製開始点）を含むであろう発現ベクターを作製することもできる。加えて、任意の数の種々の周知のプロモーター、例えばラクトースプロモーター系、ト

リブトファン(*trp*)プロモーター系、ターラクターメゼプロモーター系、またはメファージからのプロモーター系が存在するだろう。プロモーターは、典型的には所望によりオペレーター配列と共に発現を調節し、そして転写および翻訳を開始および終了させるためのリボソーム結合部位を有するだろう。

他の微生物、例えば酵母を発現に用いることもできる。ヤッコロミセス(*Saccharomyces*)は好ましい宿主であり、適当なベクターは、発現調節配列、例えば3'-ホスホグリセレートキナーゼおよび他の解糖酵素プロモーターを包含するプロモーター、並びに所望により複製開始点、終結配列等を有する。

微生物に加えて、哺乳動物細胞培養物を用いて本発明のポリペプチドを発現および生産せしめることもできる

(Winnacker, "From Genes to Clones", VCH Publishers, N.Y., N.Y. (1987)を参照のこと；これは参考として本明細書中に組み込まれる)。完全な免疫グロブリンを分泌することができると多数の適当な宿主細胞系が技術の現状において開発されているため実際には異種細胞が好ましい。そのような異種細胞としては、CHO細胞系、種々のCOS細胞系、HeLa細胞、ニコロマ細胞系等が挙げられるが、好ましくは形質転換されたB細胞またはハイブリドームである。それらの細胞のための発現ベクターは、発現調節配列、例えば複製開始点、プロモーター、エンハンサー(Queen, C.ら, Immunol. Rev. 89: 49-68 (1985)；これは参考として本明細書中に組み込まれる

る)、および必要なプロセッシング情報部位、例えばリボソーム結合部位、RNAスプライス部位、ポリアダニル化部位、および転写ターミネーター配列を含むことができる。好ましい発現調節配列は、エンハンサーを有するSV40(MulliganおよびBerg, Science 209: 1422-1427 (1980)を参照のこと)、免疫グロブリン遺伝子、アデノウイルス、ウシ乳頭腫ウイルス等に由来するプロモーターである。

寄目のDNAセグメント（例えば、重鎖および軽鎖コード配列並びに発現調節配列）を含むベクターは、細胞宿主のタイプに依存して異なる周知の方法により、宿主細胞中に移すことができる。例えば、原核細胞には塩化カルシウムトランスフェクション法が常用され、一方他の細胞宿主にはリン酸カルシウム処理またはエレクトロポレーションが使用される（一般には、Maniatisら, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1982)を参照のこと；これは参考として本明細書中に組み込まれる）。

一度発現されれば、本発明の完全抗体は、それらの二重体、個々の軽鎖および重鎖、または他の免疫グロブリン形態を当業界の標準法、例えば硫酸アンモニウム沈殿、アフィニティークラム、カラムクロマトグラフィー、ゲル電気泳動等に従って精製することができる（一般的には、Scopes, R., Protein Purification, Springer-Verlag, N.Y. (1982)を参照のこと）。少なくとも約90-95%均質の実質的に純粋な免疫グロブリンが好ましく、98-99%またはそれ以上の均質が重要用途に好ましい。部分的にまたは所望の時には均質まで精製

されれば、蜜法的に（体外的を含む）またはアッセイ方法、免疫蛍光染色法等を開発しそして実施する際に該ポリペプチドを使用することができる（一般的には、Immunological Methods, 第1および第2巻, LefkowitzおよびPellegrino編, Academic Press, New York, N.Y. (1979および1981)を参照のこと）。

本発明において例示されるIL-2レセプター特異抗体は、典型的にはT細胞介在性の病状状態を処置することにおいて個々に用いられるだろう。通常、病状に関連する細胞がIL-2レセプターを有すると同定された場合、ヒトIL-2レセプターへのIL-2の結合を阻止することができるヒト抗体が適当である（"Treating Human Malignancies and Disorders"と題するU.S.S. No. 085,707を参照のこと；これは参考として本明細書中に組み込まれる）。例えば、処置に適する典型的な病状状態として、器官移植、例えば心臓、肝臓、肺、腎臓、脾臓等の移植を行う患者における移植拒絶反応および対宿主性移植片病が挙げられる。他の病状としては、自己免疫疾患、例えば1型糖尿病、多発性硬化症、関節リウマチ、全身性紅斑性狼瘡および重症筋無力症が挙げられる。

本発明のヒト抗体は、別の抗体、特に病状の一因となる細胞上の別のマーカーと反応するヒトモノクローナル抗体と組合せて使用することもできる。例えば、適当なT細胞マーカーとしては、第一回国際白血球分化ワークショップ(First International Leukocyte Differentiation Workshop), Leukocyte Typing, Bernardら編, Springer-Verlag, N.Y.

(1984) (これは参考として本明細書中に組み込まれる) により命名されたいわゆる「分化のクラスター (Clusters of Differentiation)」中に分類されるものを挙げる事ができる。

抗原は、化学療法剤または免疫抑制剤と共に与えられる病々に投与される組成物として使用することができる。典型的には、そのような薬剤としては、シクロスポリンAまたはプリン類似体 (例えばメトトレキサート、6-メルカプトプリン等) が挙げられるだろうが、当業者に周知である多数の他の薬剤 (例えばシクロホスファミド、プレドニソン等) も使用することができる。

本発明の好ましい医薬組成物は、免疫系における抗原抗体の使用を含んで成る。免疫系は2つの成分により特徴づけられ、そしては臓器内または生体内において選択細胞を殺すのに特に有用である。第一成分は、付着または吸収すると細胞に対して通常は致命的である細胞毒性物質である。「デリバリー担体剤」として知られる第二成分は、毒性物質を特定の細胞タイプ、例えばがんを含む細胞に供給するための手段を提供する。この2成分は通常は種々の周知の化学的方法のいずれかによって一基に化学的に結合される。例えば、細胞毒性物質がタンパク質でありそして第二成分が完全な免疫グロブリンである時、結合は異種二価性架橋剤、例えばSPDP、カルボジイミド、グルタルアルデヒド等によることができる。種々の免疫系剤の製造が当業界で周知であり、例えば "Monoclonal Antibody-Toxin Conjugates: Aiming the Magic Bul-

let", Thorpeら、Monoclonal Antibodies in Clinical Medicine, Academic Press, 158-199 (1982) 中に見つけることができる。これは参考として本明細書中に組み込まれる。

種々の細胞毒性物質が免疫系における使用に適当である。細胞毒性物質としては、放射性核種、例えばヨウ素-131、イットリウム-90、レニウム-188 およびビスマス-212; 多数の化学療法剤、例えばビンデシン、メトトレキサート、アドリアマイシンおよびシスプラチン; 並びに細胞毒性タンパク質、例えば、リボソーム阻害タンパク質アメリカマゴボウ抗ウイルスタンパク質、シェードモナス菌毒素A、リシン、ジフテリア毒素、リシンA 相等; または細胞表面で活性な物質、例えばホスホリパーゼ酵素 (例えばホスホリパーゼC) を挙げることができる。 (1988年12月23日に提出された一般譲渡されたU.S.S. 07/290,562; "Chimeric Toxins", OlsnesおよびPhil. Pharmac. Ther., 25: 355-351 (1982); 並びに "Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy", BaldwinおよびByers 編, 159-173, 224-266 頁, Academic Press (1985) を参照のこと。これら全てが参考として本明細書中に組み込まれる。)

免疫系剤のデリバリー成分は、本発明のヒト免疫グロブリンを含むだろう。好ましくは完全な免疫グロブリンまたはそれらの結合性断片、例えば Fabが使用される。典型的には、免疫系剤の抗体はヒト IgMまたはIgG イソタイプのものであるだろう。しかし所望の時には他の哺乳動物系常領域を用いることもできる。

本発明のヒト抗体およびその医薬組成物は、特に非癌口、即ち皮下、筋肉内または静脈内投与に有用である。非癌口投与用組成物は、通常、許容される量、好ましくは水性組成中に溶解された抗体の溶液または混合物を含んで成るだろう。種々の水性組成、例えば水、炭酸水、0.4% 食塩水、0.3% グリシン等を使用することができる。それらの溶液は無菌であり、通常は収容物質を含まない。それらの組成物は、常用される周知の滅菌技術により滅菌することができる。組成物は、適切な生理的条件下に必要である時は医薬上許容される補助物質、例えばpH調整剤および緩衝剤、等性調整剤等、例えば酢酸ナトリウム、塩化ナトリウム、塩化カリウム、塩化カルシウム、乳酸ナトリウム等を含有することができる。それらの組成物中の抗体の濃度は広範囲に渡り異なることができ、即ち、少なくとも約0.5% 未満から、通常は少なくとも約1% から、15-20重量% はどまでに及ぶことができ、そして液体の粘度、粘度等に主として基づいて、選択された特定の投与形式に従って選択されるだろう。

筋肉内注射用の典型的医薬組成物は、1mlの無菌滅菌液と50mgの抗体を含むように調製することができる。静脈点滴注入用の典型的医薬組成物は、250mlの無菌リンガー液と150mgの抗体を含むように調製することができる。非癌口投与可能な組成物の実質的調製方法は当業者に周知であるかまたは明白であり、そして例えば Reeington's Pharmaceutical Science, 第15版, Mack Publishing Company, Easton, Pennsylvania (1980) 中に詳細に記載されており、これは参考として

本明細書中に組み込まれる。

本発明の抗体は貯蔵のために凍結乾燥保存することができ、そして使用前に適当な媒体中で再構成することができる。この技術は従来の免疫グロブリンに関して効果的であることが示されており、当業界で周知の凍結乾燥および再構成技術を用いることができる。凍結乾燥と再構成は種々の程度の抗体活性の低下をもたらす得ること (例えば従来の免疫グロブリンでは、IgM抗体はIgG抗体よりも大きな活性低下を有する傾向がある)、そして使用レベルを調整して埋め合わせなければならないことがあることは、当業者により明白であろう。

本発明のヒト抗体またはその混合物を含む組成物は、予防および/または治療処置のために投与することができる。治療用途においては、組成物は、既に病気にかかっている患者に、病気を治療するかまたは少なくとも部分的に緩和するのに十分な量で投与される。これを達成するのに適切な量は「治療的有効量」と定義される。この用途に有効な量は、感染の程度および患者自身の免疫系の一般状態に依存するであろう。しかし通常は、用量あたり約1〜約200mgの抗体、より好ましくは患者あたり5〜25mgの用量が使用されるだろう。本発明の材料は通常は深刻な病状状態、即ち命にかかわるかまたはもしかすると命にかかわる状況において使用されるだろうことを全頭に置かなければならない。そのような場合、本発明のヒト抗体により遊離される外来物質の最小化および「外来物質」拒絶の低確率の点からみて、実質的過剰量の抗体を投与することが可能でありそして治療に

より望ましいと感じられるかもしれない。

予防用途においては、本発明の抗体またはその混合物を含有する組成物は、患者の抵抗性を高めるためにまだ病変状態でない患者に投与される。そのような量は「予防的有効量」として定義される。この用途の場合、正確な量は患者の健康状態および免疫の一般レベルに依存するが、通常は用量あたり0.1~25 $\mu$ g、特に患者あたり0.5~2.5 $\mu$ gであろう。好ましい予防用途は、腎臓移植拒絶の防止である。

本発明のヒト抗体は、更に試験管内において広範な用途を見出すことができる。一例として、T細胞の型決定、特異的IL-2レセプターを有する細胞または抗レセプターの断片の単離、ワクチンの調製等に広範な抗体を利用することができる。

診断目的に、抗体を標識してもよくまたは未標識であってもよい。未標識抗体は、ヒト抗体と反応性である別の標識抗体（二次抗体）、例えばヒト免疫グロブリン定常領域に特異的な抗体と組合せて使用することができる。あるいは抗体を直接標識してもよい。様々な標識、例えば放射性核種、蛍光団、酵素、酵素基質、酵素補因子、酵素阻害剤、リポンド（特にハプタン）、等を使用することができる。多数の型式のイムノアッセイが利用可能であり、そして当業者に周知である。

細胞活性に対する保護もしくは検出または選択された抗原の存在の検出において問題の抗体を使用するためにキットを供給することもできる。本発明の問題の抗体組成物は、単独

でまたは所望の細胞タイプに特異的な追加の抗体と共に、普通は1つの容器に凍結乾燥形態で提供することができる。抗体は標識もしくは薬品と混合されていても未混合であってもよく、緩衝液、例えばTris、リン酸塩、炭酸塩等の緩衝液、安定剤、防腐剤、不活性タンパク質、例えば血清アルブミン等、および使用説明書のセットと共にキット中に含まれる。一般にそれらの材料は活性抗体の量を基にして約0.001重量%の合計量において存在するだろう。しばしば、活性成分を希釈するための不活性増量剤または賦形剤を含めることが望ましく、この場合賦形剤は全組成の約1~99重量%で存在することができる。モノクローナル抗体を結合することができる二次抗体をアッセイにおいて使用することができ、これは通常は別の容器中に存在するだろう。二次抗体は典型的には標識と結合され、上述の抗体製剤と同様にして製剤化される。

次の実施例は例示の目的で与えられ、限定のためではない。

## 実 験

### ヒト抗体および重鎖遺伝子の設計

ヒト抗体のフレームワークを提供するためにヒト抗体Euの配列(Sequences of Proteins of Immunological Interest, Kabat, E.ら, U.S. Dept. of Health and Human Services, 1983)を使用した。というのは、抗-Tacの重鎖のアミノ酸配列がNational Biomedical Foundation Protein Identification Resource 中の他のいずれの重鎖配列よりもこの抗体

の重鎖に相溶性が高かったためである。

ヒト化重鎖の配列を選択するために、抗-Tac 重鎖配列（一般領域されたU.S.S.N.の 186,862と223,037を参照のこと。これらは参考として本明細書中に組み込まれる）をEu重鎖配列と整列した（図1）。各位置において、その位置が次のカテゴリーのいずれか1つに入らない限り、Euアミノ酸をヒト化配列のために選択した。次のカテゴリーのいずれか1つに入る場合、抗-Tac アミノ酸を選択した。

(1) その位置が、Kabatら、前掲により定義されたような相補性決定領域(CDR) 中にある（アミノ酸31-35、50-66、99-105）；

(2) その位置ではEuアミノ酸がヒト重鎖配列にまれであり、一方抗-Tac アミノ酸がその位置でヒト重鎖配列に典型的であった（アミノ酸27、93、95、98、107-109、111）；

(3) その位置が抗-Tac 重鎖のアミノ酸配列中のCDRのすぐ近くであった（アミノ酸30と67）；

(4) 抗-Tac 抗体の3次元モデルが、該アミノ酸が抗原結合部位に物理的に密接していることを示唆した（アミノ酸43と63）。

残りのアミノ酸はそれらのカテゴリーのうちの複数に入るが、それらは1つのカテゴリーにのみ属してある。

ヒト化重鎖の配列を選択するために、抗-Tac 軽鎖配列をEu軽鎖の配列と整列させた（図2）。その位置が同じカテゴリー(1)~(4)のうちの1つに入らない限り、Euアミノ酸を各位置において選択した（カテゴリー定義中の重

鎖を軽鎖で置き換える）：

(1) CDR（アミノ酸24-34、50-55、89-97）。

(2) Euよりも抗-Tac アミノ酸がより典型的である（アミノ酸48と53）。

(3) CDRに近い（アミノ酸なし；Euと抗-Tac はそれらの位置全てにおいて互に同じであった）。

(4) 結合領域に3次元的に近接している可能性（アミノ酸60）。

重鎖（図3）と軽鎖（図4）の実験のスクレオチド配列は次のようにして選択した。

(1) 該スクレオチド配列は上述のようにして選択したアミノ酸配列をコードする。

(2) それらのコード配列の5'側のスクレオチド配列はリーダー（シグナル）配列、即ちMOPC 53抗体の軽鎖のリーダーおよびPCII 108A抗体の重鎖のリーダー（Kabatら、前掲）をコードする。それらのリーダー配列を抗体の典型として選択した。

(3) コード配列の3'側のスクレオチド配列は、抗-Tac配列の一部分であるマウス軽鎖J5セグメントおよびマウス重鎖J5セグメントに従う配列である。それらの配列はスプライス供与配列を含有するために含まれる。

(4) 配列の各末端には、XbaI 部位での切断およびベクターのIbaI 部位へのクローニングを可能にするためのIbaI 部位が存在する。

ヒト化抗体および重鎖遺伝子の作製

重鎖を合成するために、Applied Biosystems 380B DNA合成装置を使って4つのオリゴヌクレオチド NES12, NES13, NES14, NES15 (図5A)を合成した。それらのオリゴヌクレオチドの2つは、重鎖の各鎖の一部であり、そして各オリゴヌクレオチドはアニーリングを可能にするために約20ヌクレオチドが次のヌクレオチドとオーバーラップしている (図5B)。各オリゴヌクレオチドは一緒にすると、XbaI 部位での切断を可能にするために各鎖に幾つかの余分なヌクレオチドを有する完全なヒト化重鎖をカバーする。該オリゴヌクレオチドをポリアクリルアミドゲルから精製した。

各オリゴヌクレオチドを、標準手順 (Maniatis, 前掲を参照のこと) によりATPとT4ポリヌクレオチドキナーゼを使ってリン酸化した。リン酸化したオリゴヌクレオチドをアニーリングするために、それらを各々約3.75μlの濃度において40μlのTA (33mM Tris-HCl, pH7.9, 66mM酢酸カリウム、10mM酢酸マグネシウム) 中に一緒に懸濁し、4分間95℃に加熱し、そして4℃にゆっくり冷却した。各オリゴヌクレオチドの反対鎖を合成することにより該オリゴヌクレオチドから完全な遺伝子を合成するために (図5C)、次の成分を100μlの最終容量において添加した:

- 10μl アニールしたオリゴヌクレオチド
- 各0.16mM デオキシリボヌクレオチド
- 0.5mM ATP
- 0.5mM DTT

ヌクレオチドをポリアクリルアミドゲルから精製した。

軽鎖遺伝子はそれらのオリゴヌクレオチドから2部分において合成した。JF01とJF02を各々0.5μlを20μlのシークエナーゼ緩衝液 (40mM Tris-HCl, pH7.5, 20mM塩化マグネシウム、50mM塩化ナトリウム) 中に混合し、70℃に3分間加熱し、そして該オリゴヌクレオチドをアニーリングさせるためにゆっくりと23℃まで冷却した。JF03とJF04も同様にして処理した。各反応液をDTT 10mMおよび各デオキシヌクレオチド0.5mMにし、6.5uのシークエナーゼ (US Biochemicals) を最終容量24μlにおいて添加し、そして37℃で1時間インキュベートして該ヌクレオチドの反応方向性を合意した。各反応液に XbaI と HindIII を添加してDNAを消化した (JF02とJF03がオーバーラップする領域の中、従って合成されたDNAの各々の中にHindIII部位が存在する: 図6B)。反応液をポリアクリルアミドゲル上で泳動し、XbaI-HindIII断片を精製し、そして標準法により pUC18中にクローニングした。各断片について数個のプラスミド単離物をジデオキシ性により配列決定し、そして正しいものを選択した。

ヒト化抗体および重鎖を発現させるためのプラスミドの作製

重鎖 XbaI断片が挿入されている pUC19プラスミドから該断片を単離し、そして標準法により正しい方向においてベクターpV71 (一般に製造されたU.S.S.N. 223, 037 を参照のこと) の XbaI 部位に挿入し、プラスミドpHuGTAC1 (図7) を作製した。このプラスミドは、適当な宿主細胞中にトランスフェクトすると高レベルの完全重鎖を発現するだろう。

100μl BSA

3.5μl T4 g43タンパク質 (DNAポリメラーゼ)

25μl T4 g44/62タンパク質  
(ポリメラーゼ補助タンパク質)

25μl 45タンパク質 (ポリメラーゼ補助タンパク質)

この混合物を37℃で30分間インキュベートした。次いで10uのT4 DNAリガーゼを添加し、そして37℃で30分間インキュベートした。70℃で15分間反応液をインキュベートすることにより、ポリメラーゼとリガーゼを不活性化した。遺伝子を XbaI で消化するために、反応液に 200μlのBSAと1mMのDTTを含む50μlの2×TA、43μlの水、および5μl中の50uの XbaI を添加した。反応液を37℃で3時間インキュベートし、そしてゲル上で泳動した。ゲルから 43bpの XbaI断片を精製し、そして標準法によりプラスミドpUC19の XbaI 部位中にクローニングした。4つのプラスミド単離物を精製し、ジデオキシ法を使って配列決定した。そのうちの1つが正しい配列を有した (図3)。

軽鎖を合成するために、4つのオリゴヌクレオチドJF01, JF02, JF03, JF04 (図6A)を合成した。それらのオリゴヌクレオチドの2つは、軽鎖の各鎖の一部であり、そして各オリゴヌクレオチドはアニーリングを可能にするために約20ヌクレオチドが次のヌクレオチドとオーバーラップしている (図6B)。該オリゴヌクレオチドは一緒にすると、XbaI 部位での切断を可能にするために各鎖に幾つかの余分なヌクレオチドを有する完全なヒト化軽鎖をカバーする。該オリ

2つの軽鎖 XbaI-HindIII断片が挿入されている各 pUC18 プラスミドからそれらの断片を単離した。ベクタープラスミドpVx1 (一般に製造されたU.S.S.N. 223, 037 を参照のこと) を XbaI で切断し、標準法により脱リン酸しそして2断片を連結せしめた。所望の反応生成物は次のような図状形を有する: ベクター-XbaI断片1-HindIII断片2-XbaI-ベクター。数個のプラスミド単離物を制限マッピングと配列決定により分析し、この形態を有する1つのプラスミドを選択した。このプラスミドpHuLTAC (図8) は完全なヒト化軽鎖 (図4) を含有し、適当な宿主細胞中にトランスフェクトすると高レベルの軽鎖を発現するだろう。

ヒト化抗体の合成および検力

プラスミドpHuGTAC1およびpHuLTAC をマウス Sp2/O細胞中にトランスフェクトし、そして該プラスミドを組み込んだ細胞を、プラスミド上の *apf* および *hys* 遺伝子 (図7, 8) により付与されるミコフェノール酸および/またはヒグロマイシンBに対する耐性に基づいて標準法により選択した。それらの細胞がIL-2レセプターに結合する抗体を分泌したことを確かめるために、細胞からの上清をIL-2レセプターを発現することが知られている HUT-102 細胞と共にインキュベートした。洗浄後、細胞をフルオレセイン接合ヤギ抗ヒト抗体と共にインキュベートし、洗浄し、そして FACSCAN フluorescence Activated Cell Sorter 上で蛍光について分析した。結果 (図9A) は、ヒト化抗体がそれらの細胞には結合するが、IL-2レセプターを発現しないJerkat T細胞には結合しない。

い(図9D)ことを明らかに示す。対照として、もとのマウス抗-Tac抗体を用いてそれらの細胞を染色すると同様な結果を与えた(図9B、C)。

更なる実験のために、ヒト化抗体を生産する細胞をマウスに注入し、そして生じた腹水を回収した。標準法に従って Affigel-10支持体(Bio-Rad Laboratories, Inc., Richmond, CA)上に固定されたヤギ抗ヒト免疫グロブリン抗体のアフィニティークラムに通過させることにより、腹水からヒト化抗体を実質上均質まで精製した。もとの抗-Tac抗体と比較してヒト化抗体の親和力を測定するために、競合的結合実験を行った。約 $5 \times 10^5$ 個の HUT-102 細胞を懸濁液(10-40ng)の抗-Tac抗体とヒト化抗-Tac抗体と共に4で30分間インキュベートした。次いで細胞に100ngのビオチン化抗-Tacを追加し、そして4で30分間インキュベートした。この量の抗-Tacは細胞上の結合部位を飽和するのに十分であり、大過剰であってはならないことが予め決定されている。0.1%アジ化ナトリウムを含む2mlのリン酸緩衝化塩溶液(PBS)で細胞を2回洗浄した。次いで250ngのフィコニリン接合アビジンと共に細胞を4で30分間インキュベートし、この接合アビジンは既に細胞に結合しているビオチン化抗-Tacに結合した。細胞を上記のように再び洗浄し、1%パラホルムアルデヒドを含むPBS中で固定し、そしてFACSCANナイトフルオロメーター上で蛍光分析した。

第一段階における融合体としての抗-Tac抗体の使用量を増加していくと(10-40ng)、第二段階において細胞に結合

することができたビオチン化抗-Tacの量を減少させ、従って最終段階において結合したフィコニリン接合アビジンの量を減少させ、こうして蛍光を減少させた(図10A)。当量(20ng)の抗-Tacおよび融合体として使ったヒト化抗-Tacは、蛍光をほぼ同じ程度に減少させた(図10B)。このことは、それらの抗体がほぼ同じ親和力(3-4倍以内)を有することを示す。というのは、もし一万がずっと大きな親和力を有するなら、より有効にビオチン化抗-Tacと競争し、従って蛍光をもっと減少させたであろうからである。

#### ヒト化抗体の生物学的性質

ヒトの病気の処置における最適な使用のため、ヒト化抗体はIL-2レセプターを発現している体内のT細胞を誘導することができるべきである。抗体が標的細胞を破壊する1つの機構は、ADCCと称される抗体依存性細胞傷害作用(Fundamental Immunology, Paul, N. 編, Raven Press, New York (1984), 681頁)であり、この場合抗体は、標的細胞と標的を溶解することができるマクロファージのようなエフェクター細胞との間に架橋を形成する。ヒト化抗体と元のマウス抗-Tac抗体がADCCを媒介することができるかどうかを決定するために、標準法によりクロム放出アッセイを行った。詳しくは、IL-2レセプターを発現するヒト白血病HUT-102細胞を $^{51}\text{Cr}$ と共にインキュベートし、それらにこの放射性核種を吸収させた。次いでHUT-102細胞を過剰量の抗-Tacまたはヒト化抗-Tac抗体のいずれか一方と共にインキュベートした。次にヒト細胞とIL-2との約20時間のインキュ

ベーションによって活性化された通常の精製ヒト末梢血単核細胞である30:1または100:1の比のエフェクター細胞と共に4時間インキュベートした。標的HUT-102細胞の溶解を示す $^{51}\text{Cr}$ の放出を測定し、そしてバックグラウンドを差し引いた(表1)。その結果は、どちらの比のエフェクター細胞においても、抗-Tacは有意な数の標的細胞を溶解しなかった(5%未満)が、一方ヒト化抗体は溶解した(20%より多く)ことを示す。従って、ヒト化抗体は、T細胞白血病または他のT細胞介在性の病気を治療することにおいて、おそらく元のマウス抗体よりも効果的であろう。

表 1

ADCC後の $^{51}\text{Cr}$ 放出率(%)

抗 体	エフェクター:標的比	
	30:1	100:1
抗-Tac	4%	<1%
ヒト化抗-Tac	24%	23%

上記から、本発明のヒト免疫グロブリンが他の抗体の多数の利点を提供することは明らかであろう。例えば、抗-Tacマウスモノクローナル抗体と比較すると、本発明のヒトIL-2レセプター免疫グロブリンは、より経済的に生産することができ、そして実質的に少ない外来アミノ酸配列を含むことができる。ヒト型への注入時に抗原性となる可能性の減少は、上記の基礎に従って設計された免疫グロブリンにとって有意な薬理的改善を意味する。

本発明を明確化および理解のために説明および実施例によ

り説明詳細に記載してきたが、添付の請求の範囲内で幾つかの変更および改良を行い得ることは明らかであろう。







[illegible]

1. ANALYSIS OF THE DATA OF THE EXPERIMENT

Interventions Group II and Group I are selected as mutually exclusive episodes in an intermediate-level process functional set.

Interventions Group I and Group II are selected as constitutive and complementary. Also, the product of Group one can be seen as a subcomponent method, which differs from the overall of Group II.

U. S. GOVERNMENT PRINTING OFFICE: 1965 O - 340-000		
U. S. GOVERNMENT PRINTING OFFICE: 1965 O - 340-000		
Y	<u>Science</u> , Volume 229 Issued 30 September 1965 <u>TRANSFORMATIONS</u> provide novel chromatin antibodies." pp. 1222-1227. See entire document.	16-22
Y	<u>Science</u> , Volume 232 Issued 09 May 1966 <u>MALWANT</u> "On structure, function and expression of secretory proteins in normal and malignant lymphocytes," pp. 717-722. See entire document.	1-17
Y	<u>Journal of Immunology</u> , Volume 126(4) Issued in April 1961 <u>COHEN</u> , "A monoclonal antibody (anti-Zac) reacting with activated and functionally active human T cells." See entire document.	1-6 16-15 1-17 1-17
Y	<u>Science</u> , Volume 239 Issued 25 March 1968 <u>VERGOTEN ET AL</u> "Reshaping human antibodies: grafting an antilysozyme activity," pp. 1134-1136. See entire document.	16-22 1-17
Y	<u>Nature</u> , Volume 321 Issued 29 May 1966 <u>JONES ET AL</u> "Expanding the complementarity-determining regions in a human antibody with lower free energy," pp. 122-123. See entire document.	16-22 1-17
Y	<u>Nature</u> , Volume 332 Issued 24 March 1966 <u>RENNERT</u> "A reshaping human antibodies for energy" pp. 113-116. See entire document.	16-22 1-17 1-17

第 1 頁の続き

④int. Cl. 1

識別記号

片内整理番号

A 61 K 39/395  
C 07 K 15/06  
C 12 N 5/10  
15/13  
// (C 12 P 21/08  
C 12 R 1:91)

U 8829-4C  
7731-4H

優先権主張 ④1989年 2月13日 ④米国 (U S) ④310,252

④発 明 者 セルク, ハロルド エドウィン アメリカ合衆国, カリフォルニア 94002, ベルモント, サニー  
スロープ アベニュー 1673